

PCT/JP2004/013536

17. 9. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 11 NOV 2004

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2004年 2月20日

出 願 番 号
Application Number: 特願2004-045111
[ST. 10/C]: [JP2004-045111]

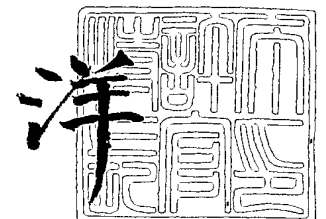
出 願 人
Applicant(s): 株式会社 免疫生物研究所

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月29日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特2004-3097940

【書類名】 特許願
【整理番号】 0310131
【提出日】 平成16年 2月20日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 群馬県前橋市下新田町 1 0 2 2 - 1 3 群馬大学医学部保健学科内
 【氏名】 山口 晴保
【発明者】
 【住所又は居所】 群馬県藤岡市中字東田 1 0 9 1 - 1 株式会社免疫生物研究所内
 【氏名】 木下 憲明
【発明者】
 【住所又は居所】 群馬県藤岡市中字東田 1 0 9 1 - 1 株式会社免疫生物研究所内
 【氏名】 前田 雅弘
【発明者】
 【住所又は居所】 群馬県藤岡市中字東田 1 0 9 1 - 1 株式会社免疫生物研究所内
 【氏名】 堀越 優子
【特許出願人】
 【識別番号】 399032282
 【氏名又は名称】 株式会社 免疫生物研究所
【代理人】
 【識別番号】 100086324
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小野 信夫
【選任した代理人】
 【識別番号】 100125748
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 高橋 徳明
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 007375
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 9906100
 【包括委任状番号】 0305546

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

アミロイド β の N 端ペプチドを認識し、かつアミロイド β 前駆体蛋白を認識しないことを特徴とするモノクローナル抗体。

【請求項 2】

アミロイド β の N 端ペプチドが、次のアミノ酸配列 (a) で示されるペプチドである請求項第 1 項記載のモノクローナル抗体。

(a) DAEFRHDSGYEVHHQK (配列番号 1)

【請求項 3】

アミロイド β の N 端ペプチドが、次のアミノ酸配列 (b) で示されるペプチドである請求項第 1 項記載のモノクローナル抗体。

(b) DAEFR (配列番号 2)

【請求項 4】

アミロイド β の N 端ペプチドと生体高分子化合物との結合物を第 1 の抗原として動物に免疫を行い、次いで、前記免疫を行った動物に前記第 1 の抗原で用いたペプチドよりも相対的に短いアミロイド β の N 端ペプチドと生体高分子化合物との結合物を第 2 の抗原として免疫を行い、当該動物から抗体を採取することにより得られる請求項第 1 項記載のモノクローナル抗体。

【請求項 5】

アミノ酸配列 (a) で示されるペプチドと生体高分子化合物との結合物を第 1 の抗原として動物に免疫を行い、次いで、前記免疫を行った動物にアミノ酸配列 (b) で示されるペプチドと生体高分子化合物との結合物を第 2 の抗原として免疫を行い、当該動物から抗体を採取することにより得られる請求項第 1 項記載のモノクローナル抗体。

(a) DAEFRHDSGYEVHHQK (配列番号 1)

(b) DAEFR (配列番号 2)

【請求項 6】

アミロイド β の N 端ペプチドを認識し、アミロイド β 前駆体蛋白を認識しない抗体を含む第 1 の試薬と、アミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を認識する抗体を含む第 2 の試薬とを含むことを特徴とするアミロイド β の測定キット。

【請求項 7】

アミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を認識する抗体が、アミロイド β の C 端ペプチドを認識する抗体である請求項第 6 項記載のアミロイド β の測定キット。

【請求項 8】

アミロイド β の C 端ペプチドが、次のアミノ酸配列 (c) で示されるペプチドである請求項第 7 項記載のアミロイド β の測定キット。

(c) MVGGVV (配列番号 3)

【請求項 9】

アミロイド β (1-40) を測定するものである請求項第 8 項記載のアミロイド β の測定キット。

【請求項 10】

アミロイド β の C 端ペプチドが、次のアミノ酸配列 (d) で示されるペプチドである請求項第 7 項記載のアミロイド β の測定キット。

(d) GVVIA (配列番号 4)

【請求項 11】

アミロイド β (1-42) を測定するものである請求項第 10 項記載のアミロイド β の測定キット。

【請求項 12】

検体中のアミロイド β に、アミロイド β の N 端ペプチドを認識し、アミロイド β 前駆体蛋白を認識しない抗体およびアミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42)

を認識する抗体を作用させることを特徴とするアミロイド β の測定方法。

【請求項 13】

アミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を認識する抗体が、アミロイド β のC端ペプチドを認識する抗体である請求項第12項記載のアミロイド β の測定方法。

【請求項 14】

アミロイド β のN端ペプチドと生体高分子化合物との結合物を第1の抗原として動物に免疫を行い、次いで、前記免疫を行った動物に前記第1の抗原で用いたペプチドよりも相対的に短いアミロイド β のN末端ペプチドと生体高分子化合物との結合物を第2の抗原として免疫を行い、当該動物から抗体を採取することを特徴とする請求項第1項記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 モノクローナル抗体およびその利用

【技術分野】

【0001】

本発明は、アミロイド β を認識するモノクローナル抗体に関し、更に詳細には、完全に全長を保持したアミロイド β (1-40) およびアミロイド β (1-42) を正確に測定することのできるモノクローナル抗体およびその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

アミロイド β は、アミロイド β 前駆体蛋白 (Amyloid Precursor Protein: APP) から β -セクレターゼおよび γ -セクレターゼにより切り出される、40アミノ酸または42アミノ酸からなるペプチドである。40アミノ酸のアミロイド β をアミロイド β (1-40) といい、42アミノ酸のアミロイド β をアミロイド β (1-42) という。以下にそれぞれのアミノ酸配列を示す。

アミロイド β (1-40) (配列番号5): DAEFRHDSGYEVHHQKLVF
FAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV

アミロイド β (1-42) (配列番号6): DAEFRHDSGYEVHHQKLVF
FAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA

【0003】

このアミロイド β の内、アミロイド β (1-40) は、通常の代謝経路により切り出されるペプチドであり毒性が弱いと言われている。一方、アミロイド β (1-42) は不溶性であり、毒性が強く、また容易に凝集、繊維化し、脳内に蓄積するためアルツハイマー症を引き起こす原因の1つともいわれている。

【0004】

従って、各アミロイド β ペプチドを測定することは、アルツハイマー症の診断や、発症に関するメカニズム等を研究する上で非常に重要である。

【0005】

これまで、アミロイド β の測定にはアミロイド β 抗体が利用されている (例えば、特許文献1)。しかしながら、前記特許文献1に記載のアミロイド β 抗体はアミロイド β のアミノ酸配列の3~8にエピトープを有するものであったため、これを利用したアミロイド β 測定キットは完全に全長を保持したアミロイド β (1-42) あるいはアミロイド β (1-40) を検出するものの、アミロイド β 前駆体蛋白 (APP) も検出するものであった。また、既に市販されているアミロイド β 抗体 (6E10: Signet Laboratories, Inc) もAPPを認識するものであった。

【0006】

【特許文献1】 国際公開第WO1994/017197号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従って、本発明は完全に全長を保持したアミロイド β (1-40) およびアミロイド β (1-42) を正確に測定できる系を提供することを課題とするものである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、完全に全長を保持したアミロイド β (1-40) およびアミロイド β (1-42) を正確に測定できる系を提供するために鋭意研究を行った結果、アミロイド β のN端ペプチドを認識し、アミロイド β 前駆体蛋白等を認識しない特異的なモノクローナル抗体を利用することで、アミロイド β (1-40) およびアミロイド β (1-42) (以下、これらを総称して「アミロイド β 」ということもある) を正確に測定できることを見出した。

【0009】

すなわち、本発明はアミロイド β のN端ペプチドを認識し、かつアミロイド β 前駆体蛋白を認識しないことを特徴とするモノクローナル抗体を提供するものである。

【0010】

また、本発明はアミロイド β のN端ペプチドを認識し、アミロイド β 前駆体蛋白を認識しない抗体を含む第1の試薬と、アミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を認識する抗体を含む第2の試薬とを含むことを特徴とするアミロイド β の測定キットを提供するものである。

【0011】

更に、本発明は検体中のアミロイド β に、アミロイド β のN端ペプチドを認識し、アミロイド β 前駆体蛋白を認識しない抗体およびアミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を認識する抗体を作用させることを特徴とするアミロイド β の測定方法を提供するものである。

【0012】

また更に、本発明はアミロイド β のN端ペプチドと生体高分子化合物との結合物を第1の抗原として動物に免疫を行い、次いで、前記免疫を行った動物に前記第1の抗原で用いたペプチドよりも相対的に短いアミロイド β のN端ペプチドと生体高分子化合物との結合物を第2の抗原として免疫を行い、当該動物から抗体を採取することを特徴とする前記モノクローナル抗体の製造方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0013】

本発明のモノクローナル抗体は、アミロイド β のN端ペプチドを認識し、かつアミロイド β 前駆体蛋白を認識しないものである。

【0014】

従って、上記抗体を利用することで、従来は困難であった、完全に全長を保持したアミロイド β (1-40) およびアミロイド β (1-42) を正確に測定することのできる系の構築が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明のアミロイド β のN端ペプチドを認識し、かつアミロイド β 前駆体蛋白を認識しないモノクローナル抗体（以下、これを「N端抗体」という）は、従来技術に基づきアミロイド β のN端ペプチドを用いて動物に免疫をしても得ることは難しい。それはアミロイド β のアミノ酸配列がアミロイド β 前駆体蛋白の一部と完全に同一であるため、両者を識別しうる抗体が得られにくいからである。

【0016】

従って、本発明のN端抗体を得るには、アミロイド β のN端ペプチドと生体高分子化合物との結合物を第1の抗原として動物に免疫を行い、次いで、前記免疫を行った動物に前記第1の抗原で用いたペプチドよりも相対的に短いアミロイド β のN末端ペプチドと生体高分子化合物との結合物を第2の抗原として免疫を行い、当該動物から抗体を採取することが必要となる。

【0017】

上記の第1の抗原および第2の抗原を用いた本発明のN端抗体の作製方法を以下に説明する。

【0018】

第1の抗原で用いられるアミロイド β のN端ペプチドは、アミロイド β (1-40) あるいはアミロイド β (1-42) のアミノ酸配列（配列番号5あるいは配列番号6）のN末端からC末端側に連続したアミノ酸配列からなるペプチドであり、アミロイド β の1-28のアミノ酸配列からなるペプチドが好ましく、特にアミロイド β のアミノ酸配列の1-16を含む次のアミノ酸配列（a）で示されるペプチドが好ましい。

【0019】

(a) DAEFRHDSGYEVHHQK（配列番号1）

【0020】

上記アミノ酸配列からなるペプチドは、特に限定されることなく種々の方法で得ることができる。例えば、当業界で公知の方法により合成してもよいし、シンペップ社 (Synpep Corporation) およびタナ社 (TANA Laboratories, USA) 等から合成品を購入することもできる。

【0021】

上記のアミノ酸配列からなるペプチドは、次に生体高分子化合物と結合させ、これを第1の抗原とする。この場合には上記ペプチドのC末端側のアミノ酸にシステイン (C) を付けて結合させることが好ましい。

【0022】

上記ペプチドに結合させる生体高分子化合物の例としては、スカシ貝のヘモシアニン (以下「KLH」という)、卵白アルブミン (以下、「OVA」という)、ウシ血清アルブミン (以下「BSA」という)、ウサギ血清アルブミン (以下「RSA」という)、サイログロブリン等が挙げられ、このうちKLHおよびサイログリブリンがより好ましい。

【0023】

上記ペプチドと生体高分子化合物との結合は、例えば、混合酸無水物法 (B. F. Erlanger, et al. :J. Biol. Chem. 234 1090-1094(1954)) または活性化エステル法 (A. E. K ARU, et al. :J. Agric. Food Chem. 42 301-309(1994)) 等の公知の方法によって行うことができる。

【0024】

混合酸無水物法において用いられる混合酸無水物は、上記ペプチドを通常のショットテンーバウマン反応に付すことにより得られ、これを生体高分子化合物と反応させることにより目的とするペプチドと生体高分子化合物との結合物が作成される。この混合酸無水物法において使用されるハロ蟻酸エステルとしては、例えばクロロ蟻酸メチル、ブromo蟻酸メチル、クロロ蟻酸エチル、ブromo蟻酸エチル、クロロ蟻酸イソブチル等が挙げられる。当該方法におけるペプチドとハロ蟻酸エステルと高分子化合物の使用割合は、広い範囲から適宜選択され得る。

【0025】

なお、ショットテンーバウマン反応は塩基性化合物の存在下に行われるが、当該反応に用いられる塩基性化合物としては、ショットテンーバウマン反応に慣用の化合物、例えば、トリエチルアミン、トリメチルアミン、ピリジン、ジメチルアニリン、N-メチルモルホリン、ジアザビシクロノネン (DBN)、ジアザビシクロウンデセン (DBU)、ジアザビシクロオクタン (DABCO) 等の有機塩基、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素ナトリウム等の無機塩基等を使用することができる。

【0026】

また上記反応は、通常、-20℃から100℃、好ましくは0℃から50℃において行われ、反応時間は5分から10時間程度、好ましくは5分から2時間である。

【0027】

得られた混合酸無水物と生体高分子化合物との反応は、通常-20℃から150℃、好ましくは0℃から100℃において行われ、反応時間は5分から10時間程度、好ましくは5分から5時間である。混合酸無水物法は一般に溶媒中で行われるが、溶媒としては、混合酸無水物法に慣用されているいずれの溶媒も使用可能であり、具体的にはジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素類、ジエチルエーテル、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメトキシエタン等のエーテル類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類、N, N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ヘキサメチルリン酸トリアミド等の非プロトン性極性溶媒等が挙げられる。

【0028】

一方、活性化エステル法は、一般に以下のように行うことができる。まず、上記ペプチドを有機溶媒に溶解し、カップリング剤の存在下にてN-ヒドロキシコハク酸イミドと反

応させ、N-ヒドロキシコハク酸イミド活性化エステルを生成する。

【0029】

当該反応に用いられるカップリング剤としては、縮合反応に慣用されている通常のカップリング剤を使用でき、例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド、カルボニルジイミダゾール、水溶性カルボジイミド等が挙げられる。また、有機溶媒としては、例えばN, N-ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド、ジオキサン等が使用できる。反応に使用するペプチドとN-ヒドロキシコハク酸イミド等のカップリング剤のモル比は好ましくは1:10~10:1、最も好ましくは1:1である。反応温度は、0~50℃、好ましくは22~27℃で、反応時間は5分~24時間、好ましくは1~2時間である。反応温度は各々の融点以上沸点以下の温度で行うことができる。

【0030】

カップリング反応後、反応液を生体高分子化合物を溶解した溶液に加え反応させると、例えば生体高分子化合物が遊離のアミノ基を有する場合、当該アミノ基と上記ペプチドのカルボキシル基の間に酸アミド結合が生成される。反応温度は、0~60℃、好ましくは5~40℃、より好ましくは22~27℃で、反応時間は5分~24時間、好ましくは1~16時間、より好ましくは1~2時間である。

【0031】

上記いずれかの方法により得られた反応物を、透析、脱塩カラム等によって精製することにより、上記ペプチドと生体高分子化合物との結合物（以下、単に「結合物1」ということがある）を得ることができる。

【0032】

一方、第2の抗原で用いられる、前記第1の抗原で用いたペプチドよりも相対的に短いアミロイドβのN端ペプチドとは、前記第1の抗原で用いたペプチドと同様に、アミロイドβのアミノ酸配列のN末端からC末端側に連続したアミノ酸配列からなるペプチドであって、そのペプチドの長さが相対的に短いペプチドであれば特に制限されないが、第1の抗原で用いたペプチドよりも3~11アミノ酸、好ましくは5~11アミノ酸短いペプチドである。この様なペプチドとしては、アミロイドβの1~13のアミノ酸配列からなるペプチドが好ましく、アミロイドβの1~11のアミノ酸配列からなるペプチドがより好ましく、特にアミロイドβのアミノ酸配列の1~5を含む次のアミノ酸配列（b）で示されるペプチドが好ましい。

【0033】

(b) DAEFR（配列番号2）

【0034】

上記ペプチドは、結合物1を作成するのと同様の方法で生体高分子化合物との結合物（以下、単に「結合物2」ということがある）を作製することができる。

【0035】

次に、上記のようにして得られた結合物1および結合物2を抗原とし、これを用いるN端抗体の製造方法について説明する。なお、抗体の調製にあたっては、抗原として結合物1および結合物2を用いる以外は、公知の方法、例えば続生化学実験講座、免疫生化学研究法（日本生化学会編）等に記載の方法を適宜利用することができる。

【0036】

上記結合物を使用して本発明のN端抗体を作製するには、まず結合物1を第1の抗原として動物に免疫を行い、次いで、前記免疫を行った動物に結合物2を第2の抗原として免疫を行い、当該動物から抗体を採取すれば良い。

【0037】

具体的な免疫方法としては、まず、結合物1をリン酸ナトリウム緩衝液（以下、「PBS」という）に溶解し、これとフロイント完全アジュバントまたは不完全アジュバント、あるいはミョウバン等の補助剤と混合し、これを第1の抗原として動物を免疫する。

【0038】

免疫される動物としては当該分野で常用されたものをいずれも使用できるが、例えば、

マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等の哺乳動物を挙げることができる。また、免疫の際の免疫原の投与法は、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮内注射、筋肉内注射のいずれでもよいが、皮下注射または腹腔内注射が好ましい。免疫は、1回または適当な間隔で複数回、好ましくは1週間ないし5週間の間隔で複数回行うことができる。

【0039】

次いで、上記のように第1の抗原で免疫を行った動物に、第1の抗原と同様に結合物2を用いて第2の抗原を作製し、これにより免疫を行う。免疫は、第1の抗原を免役すると同様に、1回または適当な間隔で複数回、好ましくは1週間ないし5週間の間隔で複数回行うことができる。

【0040】

最後に、常法に従い、上記の免疫を行った動物から得た免疫細胞と、ミエローマ細胞とを融合させてハイブリドーマを得、当該ハイブリドーマの培養物から抗体を採取することによってアミロイド β のN端に対するモノクローナル抗体を得ることができる。

【0041】

斯くして得られる本発明のN端抗体は、必要により標識ないし固相化することにより免疫学的測定法に利用することができる。

【0042】

このうち標識は、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリフォスファターゼ等の酵素、フルオレセインイソシアネート、ローダミン等の蛍光物質、 ^{32}P 、 ^{125}I 等の放射性物質、化学発光物質等の標識物質とN端抗体とを結合させることにより行われる。また、固相化は適切な固相にN端抗体を結合させることにより行われる。固相としては、免疫化学的測定法において慣用される固相の何れをも使用することができ、例えば、ポリスチレン製の96穴マイクロタイタープレート、アミノ基結合型のマイクロタイタープレート等のプレートや、各種のビーズ類が挙げられる。N端抗体を固相化させるには、例えば、抗体を含む緩衝液を担体上に加え、インキュベーションすればよい。

【0043】

また特に、本発明のN端抗体はアミロイド β (1-40)またはアミロイド β (1-42)を認識する抗体を認識する抗体と組み合わせることにより、アミロイド β を正確に測定することができる。

【0044】

このようなアミロイド β (1-40)またはアミロイド β (1-42)を認識する抗体としては、例えば、アミロイド β (1-40)またはアミロイド β (1-42)のアミノ酸配列の一部または全部を抗原として、常法により得ることができるポリクローナル抗体やモノクローナル抗体が利用できる。本発明においては、これらの抗体の中でも、特にアミロイド β のC端ペプチドを認識する抗体(以下、「C端抗体」という)を使用することが、測定の正確さから好ましい。

【0045】

上記C端抗体は、測定対象とするアミロイド β (1-40)またはアミロイド β (1-42)のC端ペプチドを識別する抗体であれば特に制限されないが、測定対象とするアミロイド β (1-40)またはアミロイド β (1-42)以外のアミロイド β (1-43)等を認識しない抗体が好ましい。

【0046】

具体的にアミロイド β (1-40)を認識するC端抗体(以下、「C端抗体1」という)は、アミロイド β (1-40)(配列番号5)のC末端からN末端側に連続したアミノ酸配列からなるペプチド(C端ペプチド)を抗原として、常法により得ることができる。より具体的に抗原とするC端ペプチドは、アミロイド β (1-40)の18~40のアミノ酸配列からなるペプチドが好ましく、特にアミロイド β (1-40)の35~40からなる次のアミノ酸配列(c)で示されるペプチドが好ましい。

【0047】

(c) MVGGVV (配列番号3)

【0048】

同様に、アミロイド β (1-42) を認識するC端抗体 (以下、「C端抗体2」という) は、アミロイド β (1-42) (配列番号6) のC末端からN末端側に連続したアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として、常法により得ることができる。より具体的に抗原とするペプチドは、アミロイド β (1-42) の18~42のアミノ酸配列からなるペプチドが好ましく、特にアミロイド β (1-42) の38~42からなる次のアミノ酸配列 (d) で示されるペプチドが好ましい。

【0049】

(d) G V V I A (配列番号4)

【0050】

また、上記ペプチドを用いてC端抗体を作製する場合、抗原として前記N端抗体の作製方法と同様に、上記ペプチドと生体高分子化合物との結合物を利用しても良い。この上記ペプチドと生体高分子化合物との結合物は、上記ペプチドのN末端側のアミノ酸に、例えばリジン・システイン (KC) を付けて結合させることが好ましい。

【0051】

上記のようなアミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を認識する抗体としては株式会社免疫生物研究所から市販されている下記のものを利用することもできる。

Anti-Human Amyloid β (35-40) (1A10) Mouse IgG MoAb (製品番号:10047)

Anti-Human Amyloid β (1-40) Rabbit IgG Affinity Purify (製品番号:18580)

Anti-Human Amyloid β (1-42) Rabbit IgG Affinity Purify (製品番号:18582)

【0052】

本発明のN端抗体とアミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を認識する抗体とを利用すればアミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を正確に測定することができる。具体的な測定方法としては、放射性同位元素免疫測定法 (RIA法)、ELISA法 (E. Engvall et al., (1980): Methods in Enzymol., 70, 419-439)、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、凝集法、オクタロニー (Ouchterlony)、イムノクロマト法等の、一般の免疫化学的測定法において使用されている種々の方法 (「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30頁-第53頁、昭和57年3月5日) が挙げられる。

【0053】

これらの測定方法は種々の観点から適宜選択することができるが、感度、簡便性等の点からはELISA法が好ましい。より具体的な、アミロイド β の測定について、ELISA法の一つであるサンドイッチ法を例にとってその手順を説明すれば次の通りである。

【0054】

まず、工程 (A) として、アミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を認識する抗体を担体に固相化し、次いで、工程 (B) として、抗体が固相化されていない担体表面をアミロイド β と無関係な、例えばタンパク質により、ブロッキングする。更に、工程 (C) として、これに各種濃度のアミロイド β を含む検体を加え、アミロイド β と抗体との複合体を生成させた後、工程 (D) として、標識した本発明のN端抗体を加え、これにアミロイド β と抗体との複合体を結合させ、最後に工程 (E) として、標識量を測定することにより、予め作成した検量線から検体中のアミロイド β の量を決定することができる。なお、工程 (A) と工程 (D) に用いる抗体は逆の場合でも測定が可能であるが、アミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を認識する抗体を固相化した方が検出感度の点から好ましい。

【0055】

具体的に工程 (A) において、アミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を認識する抗体を固相化するために用いられる担体としては、特別な制限はなく、免疫化学的測定法において常用されるものをいずれも使用することができる。例えば、ポリスチレン製の96穴マイクロタイタープレートあるいは、アミノ基結合型のマイクロタイ

タープレートが挙げられる。また、上記抗体を固相化させるには、例えば、上記抗体を含む緩衝液を担体上加え、インキュベーションすればよい。緩衝液としては公知のものが使用でき、例えば10 mMのPBSを挙げることができる。緩衝液中の上記抗体の濃度は広い範囲から選択できるが、通常0.01~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度、好ましくは0.1~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ が適している。また、担体として96ウェルのマイクロタイタープレートを使用する場合には、300 μl /ウェル以下で20~150 μl /ウェル程度が望ましい。更に、インキュベーションの条件にも特に制限はないが、通常4℃程度で一晩のインキュベーションが適している。

【0056】

また、工程(B)のブロッキングは、工程(A)で抗体を固相化した担体において、後に添加する検体中のアミロイド β が抗原抗体反応とは無関係に吸着される部分が存在する場合があるので、それを防ぐ目的で行う。ブロッキング剤としては、例えば、BSAやスキムミルク溶液や、ブロックエース(Block-Ace:大日本製薬製(コードNo. UK-25B))等の市販のブロッキング剤を使用することができる。具体的なブロッキングは、限定されるわけではないが、例えば抗原を固相化した部分に、ブロックエースを適量加え、約4℃で、一晩のインキュベーションをした後、緩衝液で洗浄することにより行われる。

【0057】

更に、工程(C)において、アミロイド β を含む検体を固相化した抗体と接触させ、この固相化した抗体でアミロイド β を捕捉し、固相化した抗体とアミロイド β との複合体を生成させる。この複合体を生成させるための条件は限定されるわけではないが、4℃~37℃程度で約1時間~1晩の反応を行えばよい。反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、未反応のタンパク質等を除去させることが好ましい。この反応に用いる緩衝液としては、10 mMのPBS(pH 7.2)および0.05%(v/v)のTween 20の組成のものが好ましい。

【0058】

また更に、工程(D)において、固相化した抗体に捕捉されたアミロイド β の別のエピトープを認識する、標識抗体を加え、固相化した抗体-アミロイド β -標識抗体の複合体を形成させる。この反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、未反応のタンパク質等を除去させることが好ましい。この反応に用いる緩衝液としては、前記したものが使用される。この工程(D)において使用される標識抗体の量は、固相化した抗体に対して約5,000~10,000倍、好ましくは最終吸光度が1.5~2.0となるように希釈された量である。希釈には緩衝液を用いることができ、反応条件は特に限定されるわけではないが、4℃~37℃程度で約1時間行い、反応後、緩衝液で洗浄することが好ましい。以上の反応により、固相化した抗体-アミロイド β -標識抗体の複合体を結合することができる。

【0059】

最後に工程(E)において、固相化した抗体-アミロイド β -標識抗体の複合体の標識物質と反応する発色基質溶液を加え、吸光度を測定することによって検量線からアミロイド β の量を算出することができる。

【0060】

標識抗体の標識物として、酵素であるペルオキシダーゼを使用する場合には、例えば、過酸化水素と3,3',5,5'-テトラメチルベンジン(以下「TMB」という)を含む発色基質溶液を使用することができる。発色反応は、限定されるわけではないが、発色基質溶液を加え約25℃で約30分間反応させた後、1~2 Nの硫酸を加えて酵素反応を停止させことにより行うことができる。TMBを使用する場合、発色は450 nmの吸光度により測定する。一方、標識物として、酵素であるアルカリホスファターゼを使用する場合には、p-ニトロフェニルリン酸を基質として発色させ、2 NのNaOHを加えて酵素反応を止め、415 nmでの吸光度を測定する方法が適している。なお、既知の濃度のアミロイド β を添加した反応液の吸光度により予め作成しておいた検量線を用いて、検体中のアミロイド β の濃度を算出できる。

【0061】

上記で説明したアミロイド β の測定方法を実施するには、本発明のN端抗体を含む第1の試薬と、アミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を認識する抗体を含む第2の試薬とを含有することを特徴とするアミロイド β の測定キット (以下、「本発明キット」という) を利用することが好ましい。

【0062】

なお、本発明キットは常法により作製することができる。具体的には、本発明のN端抗体、アミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を認識する抗体のいずれかを標識抗体とし、他に、希釈用緩衝液、標準物質、基質用緩衝液、停止液、洗浄液等を組み合わせればよい。

【0063】

上記の測定方法や測定キットを利用することにより、血漿、血清等の検体中の完全に全長を保持したアミロイド β (1-40) またはアミロイド β (1-42) を正確に測定することができる。

【実施例】

【0064】

以下、実施例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらにより何ら制約されるものではない。また当業者は、本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができるが、それらも本発明の技術的範囲に含まれる。

【0065】

実施例 1

アミロイド β のN端ペプチドおよびC端ペプチドの入手:

アミロイド β のN端ペプチドおよびC端ペプチドは、HPLCクロマトグラフィー精製した状態の品をシンペップ社 (Synpep Corporation) およびタナ社 (TANA Laboratories, USA) より購入した。それらのペプチドのアミノ酸配列は、下記の (e)、(f)、(g) および (h) に示す通りである。なお、ペプチド (e) はアミロイド β の1~16のアミノ酸配列 (配列番号1) にシステイン (C) を付けたペプチドであり、ペプチド (f) はアミロイド β の1~5のアミノ酸配列 (配列番号2) にCを付けたペプチドであり、ペプチド (g) はアミロイド β (1-40) の35~40のアミノ酸配列 (配列番号3) にKCを付けたペプチドであり、ペプチド (h) はアミロイド β (1-42) の38~42のアミノ酸配列 (配列番号4) にリジン・システイン (KC) を付けたペプチドである。

【0066】

(e) DAEFRHDSGYEVHHQKC

(f) DAEFRC

(g) KCMVGGVV

(h) KCGVVIA

【0067】

実施例 2

免疫用抗原の作製:

上記の各ペプチドとサイログロブリンとの結合物をEMCS (N-(6-Maleimidocaproyloxy)-succinimide) 法により、以下のようにして作成した。なお、結合物を作るにあたり、サイログロブリンとペプチドとEMCSのモル比をそれぞれ1:300:400とした。

【0068】

まず、実施例1の各ペプチド4mgを、それぞれ約1mlの蒸留水に溶解した。一方、1mlの0.01Mリン酸バッファー (pH 7.0) に5mgのサイログロブリンを溶解したものと、ジメチルホルムアミドで溶解したEMCS 80 μ g/ μ lとをそれぞれ上述モル相当量になるように混合し、サイログロブリン-EMCS複合体溶液を作成した。この複合体溶液を4つに分け、その各々にそれぞれのペプチド溶液を上述モル相当量加えることにより、EMCSで架橋されたペプチドとサイログロブリンとの結合物溶液を作成し

た。

【0069】

この結合物溶液を、PBSを用いて透析し、結合物として $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように濃度調製した。このようにして得られた上記の各ペプチドとサイログロブリンとの結合物を免疫用抗原として以下の実施例に用いた。

【0070】

実施例 3

アミロイド β (1-40) のC端ペプチドを認識する抗体の作製:

免疫用抗原として、実施例2において得られたペプチド(g)とサイログロブリンとの結合物を用い、1週間、または2週間おきに結合物溶液の $50\mu\text{l}$ ($50\mu\text{g}$)を投与し、マウスを免疫化した。抗原は初回免疫のみにフロイント完全アジュバントと混和し、二回目からはフロイント不完全アジュバントと混和した。免疫化されたマウスの脾単球細胞と融合パートナー、X63-Ag8-653をポリエチレングリコール仲介細胞融合に付し、文献(J. Immunol. 146:3721-3728)に述べた方法によりハイブリドーマを選択した。選択は、固定化されたペプチド(g)に反応し、ペプチド(h)には反応しないように見える細胞を選択することにより行った。

【0071】

上記のようにして選択した細胞を無血清培地のGIT培地(和光純薬)で細胞の80%が死滅するまで抗体を産生させた。次いでこの培地から遠心($1,000\text{rpm}$, 15min)により細胞を取り除いた後、硫酸アンモニウムを50%飽和状態にして 4°C で一晩静置し、沈殿を遠心($1,000\text{rpm}$, 30min)により回収した。更にこの沈殿を2倍に希釈したbinding buffer (Protein AMAPS I Kit 製)に溶解させた後、Protein Aカラム (Pharmacia-Amersham 製)にIgGを吸着させた。その後、PBS透析を一晩行って抗体を精製し、アミロイド β (1-40) のC端ペプチドを認識する抗体を得た。そしてこの抗体を1A10と名付けた。

【0072】

実施例 4

ウエスタンブロッティングによる1A10抗体の特異性の確認:

次に、実施例3で得られた1A10抗体がアミロイド β (1-40) のC端ペプチドを認識することを確認するために、1A10抗体を用いてアミロイド β (1-40)、アミロイド β (1-42) およびアミロイド β (1-43) の各ペプチドに対し、常法(例えば、「分子生物学基礎実験法」、南江堂)に従いウエスタンブロッティングを行った。

【0073】

ウエスタンブロッティングの結果を図1に示した。モノクローナル抗体1A10は、アミロイド β (1-42) およびアミロイド β (1-43) には反応せず、アミロイド β (1-40) のみを認識することが確認できた。

【0074】

実施例 5

アミロイド β (1-42) のC端ペプチドを認識する抗体の作製:

免疫用抗原として、実施例2において得られたペプチド(h)とサイログロブリンとの結合物を用い、実施例3と同様の手法に従い、マウスを免疫化した。免疫化されたマウスの脾単球細胞と融合パートナー、X63-Ag8-653をポリエチレングリコール仲介細胞融合に付し、文献(J. Immunol. 146:3721-3728)に述べた方法によりハイブリドーマを選択した。選択は、固定化されたペプチド(h)に反応し、ペプチド(g)には反応しないように見える細胞を選択することにより行った。

【0075】

上記のようにして選択した細胞を実施例3と同様に精製し、アミロイド β (1-42) のC端ペプチドを認識する抗体を得た。そしてこの抗体を1C3と名付けた。

【0076】

実施例 6

免疫沈降法による 1 C 3 抗体の反応性の確認:

次に、実施例 5 で得られた 1 C 3 抗体がアミロイド β (1-42) の C 端ペプチドを認識することを確認するために、1 C 3 抗体を用いてアミロイド β (1-40)、アミロイド β (1-41)、アミロイド β (1-42) およびアミロイド β (1-43) の各ペプチドに対し、常法 (例えば、「分子生物学基礎実験法」、南江堂) に従い免疫沈降を行った。最終のプロットによる検出には 6 E 1 0 抗体 (Signet Laboratories, Inc) を用いた。

【0077】

免疫沈降の結果を図 2 に示した。1 C 3 抗体は、アミロイド β (1-42) を特異的に認識し、アミロイド β (1-40)、アミロイド β (1-41) およびアミロイド β (1-43) を認識しないことが確認できた。

【0078】

実施例 7

アミロイド β の N 端ペプチドを認識する抗体の作製:

免疫用抗原として、実施例 2 において得られたペプチド (e) とサイログロブリンとの結合物を用い、BALB/c マウスを免疫化した。4 回免疫を行った後、さらにペプチド (f) とサイログロブリンとの結合物を用い 2 回免疫を行った。免疫化されたマウスの脾単球細胞と融合パートナー、X 63-Ag 8-653 をポリエチレングリコール仲介細胞融合に付し、文献 (J. Immunol. 146: 3721-3728) に述べた方法によりハイブリドーマを選択した。選択は、固定化されたペプチド (e) およびペプチド (f) へ反応する細胞を選択することにより行った。

【0079】

上記のようにして選択した細胞を実施例 3 と同様に精製し、アミロイド β の N 端ペプチドを認識する抗体を得た。そしてこの抗体を 82 E 1 と名付けた。

【0080】

実施例 8

ウエスタンブロッティングによる 82 E 1 抗体の特異性の確認:

次に、実施例 7 で得られた 82 E 1 抗体がアミロイド β の N 端ペプチドを認識することを確認するために、82 E 1 抗体を用いてアミロイド β (1-40)、アミロイド β (2-40) およびアミロイド β (3-40) の各ペプチドに対し、常法 (例えば、「分子生物学基礎実験法」、南江堂) に従いウエスタンブロッティングを行った。また、比較としてアミロイド β 前駆体蛋白 (APP) を強制発現させたチャイニーズハムスター細胞を、1%のTritonを含む緩衝液でホモジナイズし、遠心後の上清をサンプルとして同様にウエスタンブロッティングを行った。この上清には、APPに加え、アミロイド β および APP から β 部位により切断された β C ターミナルフラグメント (β CTF) が含まれる。さらに、従来の抗体と比較するために、上記同一サンプルを用いて、アミロイド β の N 端ペプチドを認識するといわれている 6 E 1 0 抗体 (Signet Laboratories, Inc) についてもウエスタンブロッティングをおこなった。

【0081】

ウエスタンブロッティングの結果を図 3、図 4 に示した。図 3 より 82 E 1 抗体は、アミロイド β (2-40) およびアミロイド β (3-40) には反応せず、アミロイド β (1-40) のみを認識することが確認できた。一方、6 E 1 0 抗体は、アミロイド β (1-40) には反応せず、アミロイド β (2-40) およびアミロイド β (3-40) を認識することが確認できた。また、図 4 より、モノクローナル抗体 82 E 1 は、APP には反応せず、アミロイド β および β CTF のみを認識することが確認できた。一方、6 E 1 0 抗体は、APP を認識することが確認できた。

【0082】

実施例 9

アミロイド β の N 端ペプチドを認識する抗体 (82 E 1 抗体) と HRP との結合物

の作製:

実施例7で得られた82E1抗体とHRPとの結合物は以下のように作製した。必要量のHRPを蒸留水に溶かし、NaIO₄で酸化させた後、pH4.4の1mM酢酸緩衝液に一晩透析した。また、82E1抗体の2mgもpH9.5の0.1M炭酸緩衝液に一晩透析した。これらの透析した82E1抗体とHRPを抗体1mgに対してHRPが0.4mgになるように混合し、室温で2時間反応させた。次いで、これにNaBH₄を加え氷中で2時間反応させた後PBSに一晩透析した。更に、この反応物をゲル濾過し、82E1抗体とHRPとの結合物を作製した。

【0083】

実施例 10

サンドイッチELISA法の構築:

上記実施例で得られた抗体を用いたサンドイッチELISA法の構築は以下のようにして行った。まず、20 μ g/mlの1A10抗体あるいは1C3抗体を100 μ lずつ96wellのELISA用プレートに加えた。次いで、これを4℃で一晩反応させた後、1%BSA/PBS/NaN₃溶液にてブロッキングを行い、サンドイッチELISA用プレートとした。また、実施例6で作成した82E1抗体とHRPとの結合物を標識抗体とした。

【0084】

上記ELISAプレートと標識抗体を用いて合成アミロイド β (1-40)あるいは合成アミロイド β (1-42)の各ペプチドを用いて測定を行った標準曲線の結果を図5に示す。図5中のAは、1A10抗体とHRP標識82E1抗体との組み合わせで合成アミロイド β (1-40)を測定した結果であり、図5中のBは、1C3抗体とHRP標識82E1抗体との組み合わせで合成アミロイド β (1-42)を測定した結果である。いずれも濃度依存的に良好な直線性を示した。

【産業上の利用可能性】

【0085】

本発明のアミロイド β のN端ペプチドを認識する抗体は、アミロイド β を認識し、かつアミロイド β 前駆体蛋白を認識しないものである。そして、これを利用したアミロイド β 測定キットは、これまで市販されているアミロイド β 測定キットと異なり、完全長を有するアミロイド β (1-42)あるいはアミロイド β (1-40)を正確に測定することができる。

【0086】

従って、本発明のアミロイド β 測定キットは、アミロイド β が関連するアルツハイマー症等の診断や、発症に関するメカニズム等の研究に利用することができる。具体的な一例を挙げれば β セクレターゼ阻害剤の検索を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0087】

【図1】図1は、ウエスタンブロッティングによる1A10抗体の特異性を示す図面である。

【図2】図2は、免疫沈降による1C3抗体の特異性を示す図面である。

【図3】図3は、ウエスタンブロッティングによる82E1抗体の特異性を示す図面である (A: 82E1抗体、B: 6E10抗体)。

【図4】図4は、ウエスタンブロッティングによる82E1抗体の特異性を示す図面である (A: 82E1抗体、B: 6E10抗体)。

【図5】図5は、実施例10で作製したELISAキットで合成アミロイド β を用いて測定をおこなった標準曲線の結果を示す図面である (A: 1A10抗体とHRP標識82E1抗体との組み合わせで合成アミロイド β (1-40)を測定した結果、B: 1C3抗体とHRP標識82E1抗体との組み合わせで合成アミロイド β (1-42)を測定した結果)。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.

<120> Monoclonal antibody and its utilization

<130> 0310131

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Tyr	Glu	Val	His	His	Gln	Lys
1				5					10					15	

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp	Ala	Glu	Phe	Arg
1				5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met	Val	Gly	Gly	Val	Val
1				5	

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gly Val Val Ile Ala
1 5

<210> 5

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

<210> 6

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

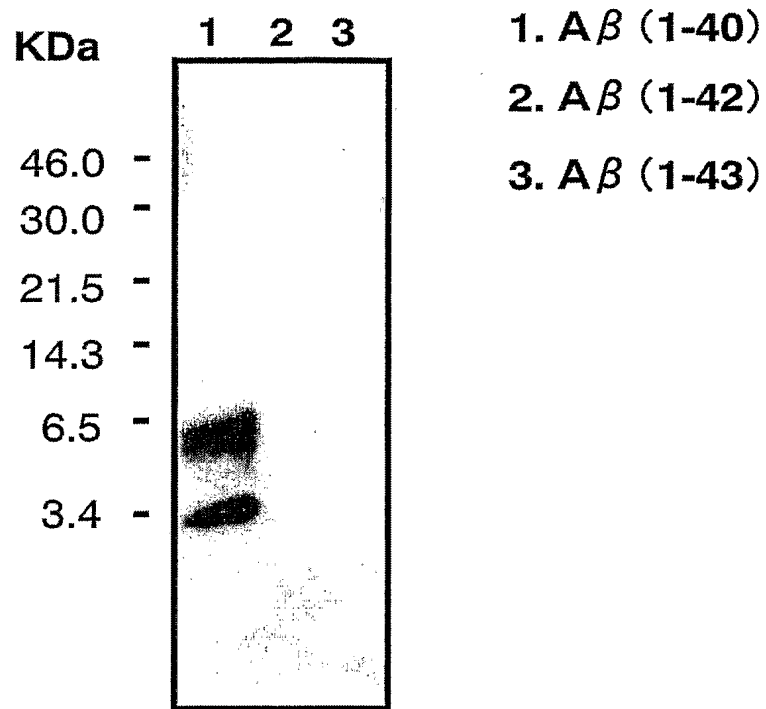
<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

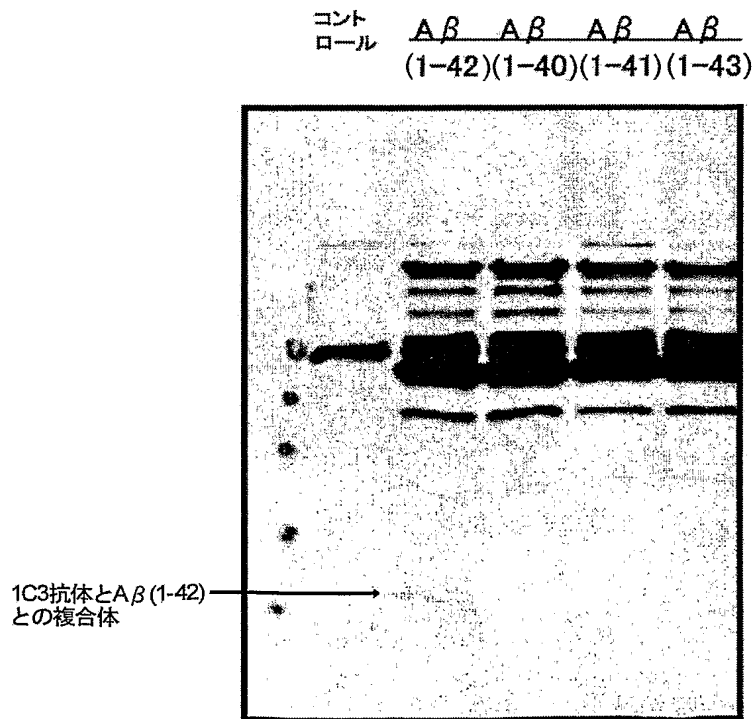
Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

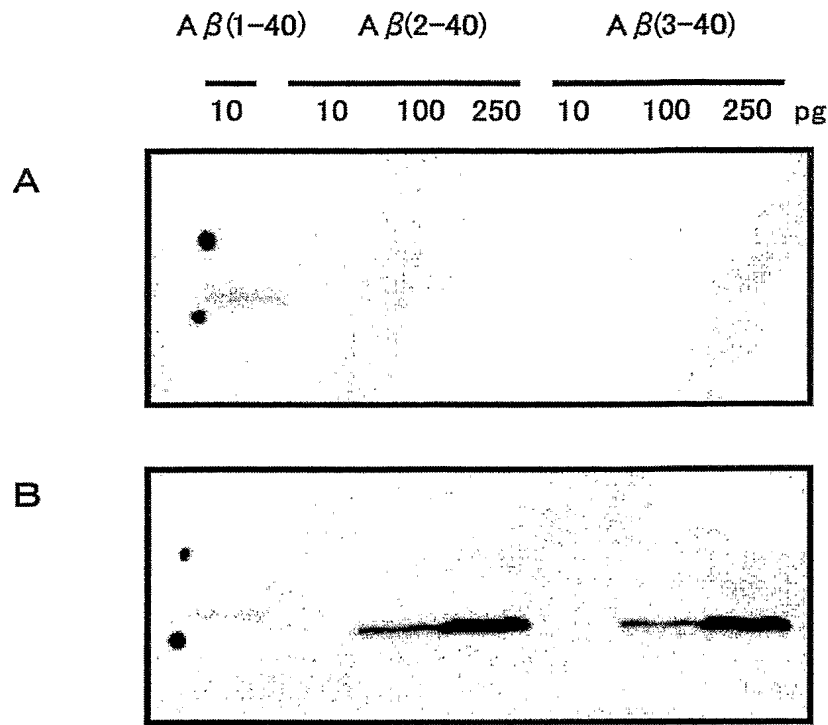
【書類名】 図面
【図 1】



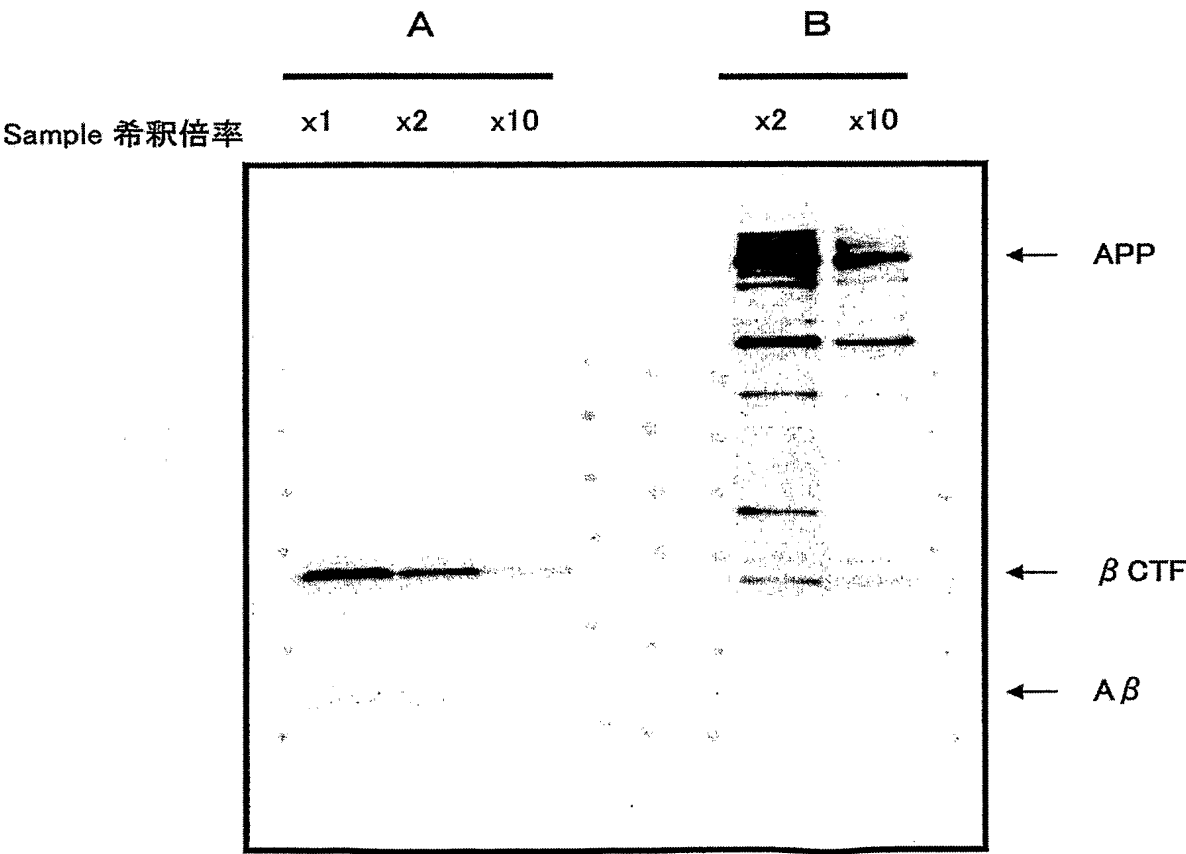
【図 2】



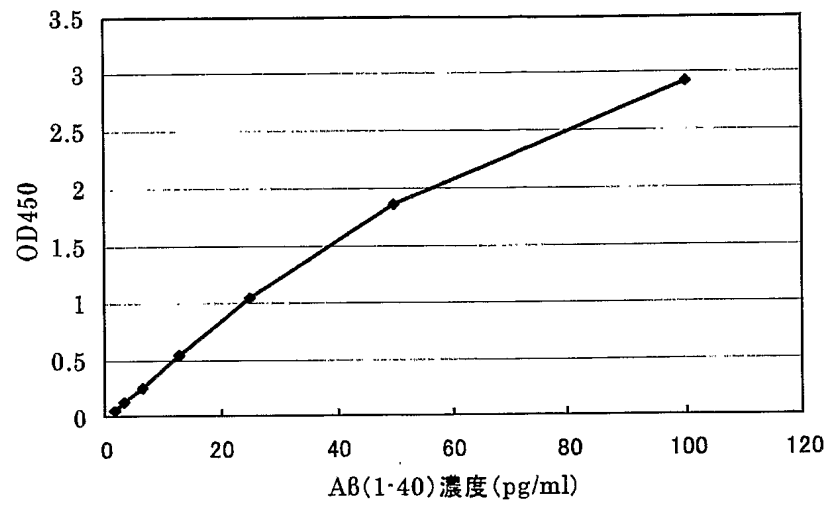
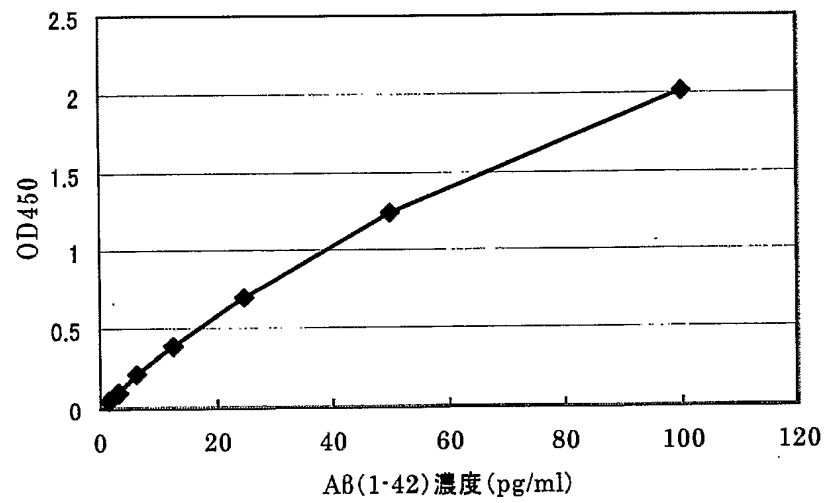
【図 3】



【図 4】



【図 5】

A**B**

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 完全に全長を保持したアミロイド β (1-40) およびアミロイド β (1-42) を正確に測定できる系を提供すること。

【解決手段】 アミロイド β の N 端ペプチドを認識し、かつアミロイド β 前駆体蛋白を認識しないことを特徴とするモノクローナル抗体およびこれを利用したアミロイド β の測定キット。

【選択図】 図 4

特願 2 0 0 4 - 0 4 5 1 1 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 9 0 3 2 2 8 2]

1. 変更年月日

1 9 9 9 年 5 月 2 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

群馬県藤岡市中字東田 1 0 9 1 - 1

氏 名

株式会社 免疫生物研究所